

**Trabajo de grado para aspirar al título de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Detección de virus Chikungunya y Zika en animales: Revisión sistemática y meta-análisis**

**Stephania Jiménez Cruz**

**Asesores:**

**Prof. Alfonso Javier Rodríguez Morales**

**Dra. D. Katterine Bonilla Aldana**

**Universidad Tecnológica de Pereira**

**Facultad Ciencias de la Salud**

**Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Pereira**

**2019**

## **Detección de virus Chikungunya y Zika en animales: Revisión sistemática y meta-análisis.**

### **Detection of Chikungunya virus and Zika virus in animals: Systematic review and meta-analysis.**

Stephania Jiménez Cruz<sup>1,2</sup>, Alfonso Javier Rodríguez Morales<sup>1,2,3,4</sup>, D. Katterine Bonilla Aldana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo y Semillero de Investigación y Salud Pública e Infección, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

<sup>2</sup>Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

<sup>3</sup>Director Grupo y Semillero de Investigación en Salud Pública e Infección, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

<sup>4</sup>Investigador Senior COLCIENCIAS, Colombia.

## **Resumen**

**Introducción:** La primera descripción de muchas enfermedades arbovirales se produjo en primer lugar en animales, incluidos múltiples alfavirus y flavivirus, como el Chikungunya (CHIKV) y el Zika (ZIKV), respectivamente. Sin embargo, todavía faltan estudios que evalúen el papel de algunas especies como reservorio, especialmente después de las intensas epidemias que acontecieron en las Américas desde 2014.

**Objetivo:** Reconocer potenciales reservorios animales de los virus del Chikungunya y Zika. **Materiales y métodos:** Se realizó una revisión sistemática de la literatura en seis bases de datos (Web of Sciences, Scopus, PubMed, SciELO, Lilacs y Google Scholar) para evaluar la proporción de animales infectados con CHIKV y ZIKV definidos por técnicas moleculares y / o inmunológicas. Se realizó un meta-análisis utilizando un modelo de efectos aleatorios para calcular la prevalencia combinada y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%), además de la media de viremia combinada (IC 95%). Se usó un nivel alfa del 5% de 2 colas para las pruebas de hipótesis. Se estimaron y reportaron medidas de heterogeneidad, incluida la estadística Q de Cochrane, el índice I<sup>2</sup> y la prueba de tau cuadrado. Los análisis de subgrupos se realizaron por arbovirus y clases de animales. **Resultados:** hasta el 1

de julio de 2019, la búsqueda en la literatura arrojó 2639 artículos (719 sobre CHIKV y 1920 sobre ZIKV), de los cuales solo 9 estudios fueron válidos para el análisis. La prevalencia combinada de CHIKV por PCR (N = 192) fue 30.1% [IC 95% (17.5% - 42.7%),  $\tau^2 = 0.160$ ,  $I^2 = 87.94$ ,  $Q = 381.43$ ,  $p < 0.001$ ], el valor más reportado fue 97.6% (*Lithobates*). La viremia media combinada de CHIKV (N = 154) fue de 2.051 log<sub>10</sub> unidades formadoras de placa (UFP) / ml [IC 95% (1.720-2.382),  $\tau^2 = 1.230$ ,  $I^2 = 99.997$ ,  $Q = 1453595.042$ ,  $p < 0.001$ ], siendo más alta en *Eptesicus fuscus* (5.500, 4.389-6.611) y *Mesocricetus auratus* (5.500, 3.484-7.516). La seroprevalencia combinada para CHIKV (N = 715) fue 38.3% [IC 95% (31.6% -45.0%),  $\tau^2 = 0.060$ ,  $I^2 = 87.967$ ,  $Q = 631.603$ ,  $p < 0.001$ ], los valores ajustados más altos fueron en *Alligator mississippiensis* (92,9%) y *Thamnophis sirtalis* (91,7%). La prevalencia combinada de ZIKV por PCR (N = 152) fue de 4.8% [IC 95% (1.0% -8.6%),  $\tau^2 < 0.001$ ,  $I^2 = 21.94$ ,  $Q = 2.562$ ,  $p = 0.013$ ], con el valor más alto reportado de 9% (*Callitrichidae*). La seroprevalencia combinada para ZIKV (N = 6119) fue del 4,3% [IC del 95% (3,0% - 5,6%),  $\tau^2 = 0,001$ ,  $I^2 = 90,495$ ,  $Q = 326,152$ ,  $p < 0,001$ ], los valores ajustados más altos estaban en *Cercopithecidae* (50%) y *Gymnocephalus cernua* (50%). La clase *Reptilia* mostró valores más altos de infección por CHIKV por PCR (66.5%, 37.4% - 95.6%). Además, la seroprevalencia de ZIKV para mamíferos fue del 4,4% (3,1% - 5,8%). **Conclusiones:** Si bien *Aedes aegypti* es crítico para las epidemias humanas de CHIKV / ZIKV, estos también participan en un ciclo de transmisión selvática que involucra reservorios animales. Muchos estudios han concluido que la frecuencia de infección y seroprevalencia entre animales es baja, sin embargo, aproximadamente un tercio de los animales probados por PCR para CHIKV fueron positivos; además con una alta seroprevalencia. Los niveles de ZIKV fueron más bajos para PCR y serología, por lo que son necesarios más estudios que evalúen la relación entre animales y arbovirus.

**Palabras claves:** Infecciones por Arbovirus, serología, reservorio.

## Abstract

**Introduction:** First description of many arboviral diseases occurred firstly in animals, including multiple alphaviruses and flaviviruses, such as chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV), respectively. Although that, there is still a lack of studies assessing its role

as reservoir, especially after intense epidemics in the Americas since 2014, particularly due to low power studies evaluating the infections by molecular or immunological techniques. **Objective:** To assess the combined prevalence of CHIKV and ZIKV infections in animals. **Methods:** We performed a systematic review of the literature in six databases (Web of Sciences, Scopus, PubMed, SciELO, Lilacs and Google Scholar) to assess the proportion of animals that were infected with CHIKV and ZIKV defined by molecular and/or immunological techniques. A meta-analysis using a random effects model was performed to calculate the pooled prevalence and 95% confidence intervals (95%CI), for viremia the pooled standardized mean and 95%CI. A 2-tailed alpha level of 5% was used for hypothesis testing. Measures of heterogeneity, including Cochran's Q statistic, the  $I^2$  index, and the tau-squared test, were estimated and reported. Subgroup analyses were conducted by arbovirus and animal classes. **Results:** Up to July 1, 2019, the literature search yielded 2639 articles (719 on CHIKV and 1920 on ZIKV), of which only 9 studies were valid for analysis. The pooled prevalence of CHIKV by PCR (N=192) was 30.1% [95%CI (17.5%-42.7%),  $\tau^2=0.160$ ,  $I^2=87.94$ ,  $Q=381.43$ ,  $p<0.001$ ], highest value reported 97.6% (*Lithobates*). For the pooled mean peak CHIKV viremia (N=154) was 2.051  $\log_{10}$  plaque-forming units (PFU)/mL [95%CI (1.720-2.382),  $\tau^2=1.230$ ,  $I^2=99.997$ ,  $Q=1453595.042$ ,  $p<0.001$ ], highest at *Eptesicus fuscus* (5.500, 4.389-6.611) and *Mesocricetus auratus* (5.500, 3.484-7.516). The pooled seroprevalence for CHIKV (N=715) was 38.3% [95%CI (31.6%-45.0%),  $\tau^2=0.060$ ,  $I^2=87.967$ ,  $Q=631.603$ ,  $p<0.001$ ], highest adjusted values were in *Alligator mississippiensis* (92.9%) and *Thamnophis sirtalis* (91.7%). The pooled prevalence of ZIKV by PCR (N=152) was 4.8% [95%CI (1.0%-8.6%),  $\tau^2<0.001$ ,  $I^2=21.94$ ,  $Q=2.562$ ,  $p=0.013$ ], highest value reported 9% (Callitrichidae). The pooled seroprevalence for ZIKV (N=6119) was 4.3% [95%CI (3.0%-5.6%),  $\tau^2=0.001$ ,  $I^2=90.495$ ,  $Q=326.152$ ,  $p<0.001$ ], highest adjusted values were in *Cercopithecidae* (50%) and *Gymnocephalus cernua* (50%). Reptilia class showed higher values of CHIKV infection by PCR (66.5%, 37.4%-95.6%). ZIKV seroprevalence for mammals was 4.4% (3.1%-5.8%). **Conclusions:** While *Aedes aegypti* is critical for human CHIKV/ZIKV epidemics, they also persist in a sylvatic transmission cycle that involves animal reservoirs. Many studies have concluded that the frequency of infection and seroprevalence for them is low among animals, however, approximately a third of

animals PCR-tested for CHIKV were positive, with higher seroprevalence. For ZIKV levels were lower for PCR and serology, but especially for the first more studies are needed.

**Keywords:** Arbovirus infections, serology, reservoirs.

## Introducción

Las enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes como las arbovirosis, se han convertido en una seria amenaza para la salud pública global, dada su capacidad de diseminarse rápidamente hacia nuevos países y continentes, y su potencial para causar grandes epidemias (1) (2). Este es el caso del virus del Chikungunya (CHIKV) y el virus del Zika (ZIKV), dos patógenos que han cobrado especial importancia durante los últimos años a causa del impacto generado sobre diferentes poblaciones humanas.

Factores como el cambio climático, la migración, el crecimiento poblacional y la globalización han contribuido a que estos virus hayan pasado de ser un problema de salud de un área restringida, a convertirse en una problemática de carácter mundial (2) (3) (4). En efecto, para finales del siglo XX, brotes esporádicos de CHIKV y ZIKV se habían reportado exclusivamente en África y Asia (5) (6), sin embargo, a principios de los años 2000, ambos virus se propagaron inicialmente hacia zonas del pacífico y posteriormente hacia diferentes regiones y países de América, Europa y Oceanía, causando brotes de gran magnitud que alcanzaron hasta el millón de infectados en algunos lugares (7) (8) (9) (10) (11).

La manifestación clínica de ambas enfermedades es similar, con síntomas que incluyen fiebre, erupciones maculopapulares, cefaleas, mialgias, artralgias, artritis y complicaciones más graves como el síndrome de Guillain-Barré y microcefalia en neonatos, especialmente en las infecciones relacionadas al virus del Zika (12) (13).

Por otro lado, se ha establecido que tanto el CHIKV como el ZIKV se mantienen en la naturaleza a través de dos ciclos de transmisión, conocidos como ciclo selvático y ciclo urbano (14) . En el primero, los virus circulan entre mosquitos generalmente del género *Aedes* los cuales actúan como vectores, y entre animales como primates no humanos que intervienen como reservorios. Aunque este ciclo es primordialmente epizootico, pueden llegar a presentarse algunos casos de infección en personas que habiten cerca de zonas selváticas (15) (16). En el segundo, la transmisión ocurre mediante un ciclo humano-mosquito-humano, entre los vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y las poblaciones humanas que sirven como reservorios, generando de esta manera los brotes de los virus del Chikungunya y Zika a nivel urbano (17) (18).

De igual manera, dada la capacidad de ambos virus de infectar una amplia variedad de especies vertebradas (17), diversos estudios han buscado identificar reservorios animales diferentes a los primates no humanos (19) (20). No obstante, no se ha determinado con claridad el papel que juegan algunos mamíferos, reptiles, anfibios o aves en la persistencia y transmisión del CHIKV y ZIKV hacia poblaciones humanas. Por tal motivo, se realizó una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis, con el fin de reconocer potenciales reservorios animales de los virus del Chikungunya y Zika en la naturaleza.

### **Virus del Chikungunya (CHIKV).**

El virus del Chikungunya es un arbovirus del género Alphavirus perteneciente a la familia Togaviridae (21). El CHIKV se compone de una cápside icosaédrica, una envoltura lipídica y un genoma ARN monocatenario positivo, el cual codifica cinco proteínas estructurales (E1, E2, E3, C, 6K) que forman el virion y cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) que participan en el proceso de replicación viral (22) (23).

De igual manera, por medio de métodos de caracterización genética, se han identificado 4 diferentes genotipos del CHIKV, denominados linaje ECSA (Este, Central y Sur África), Oeste Africano (WA), Asia/ Caribe (AC) y linaje Océano Índico (IOL) (24).

Se ha planteado que el CHIKV tuvo su origen en África, donde fue aislado por primera vez en 1953 durante una epidemia que tuvo lugar en Tanzania (25) (26). Posteriormente, el virus se propagó hacia el continente asiático, siendo reportado el primer caso de infección en 1954 en las Filipinas (5). Desde entonces y hasta finales del siglo XX, diferentes brotes esporádicos se reportaron en poblaciones urbanas de varios países de África y Asia (5) (27) (28).

Para el periodo entre 2004-2006, el virus re-emergió con mayor severidad en las costas del este de África y se diseminó hacia diversas zonas del Océano Índico y sudeste de Asia (29), afectando a miles de personas en diferentes lugares como la Réunion (266.000 personas infectadas y 237 mortalidades) (7), las Islas Comoro

(5.202 casos de infección reportados) (30) o la India, donde se vieron afectados aproximadamente 1.5 millones de personas por la epidemia del CHIKV (31).

En el 2013, el virus se identificó por primera vez en las Américas con los primeros casos de transmisión autóctona presentados en la isla caribeña de San Martín (32). A partir de ahí, el virus se extendió por el continente causando graves epidemias en países como Colombia, Brasil, Ecuador o Venezuela, con más de un millón de casos de infección reportados desde su llegada (8) (33).

En Colombia, los primeros casos de CHIKV se presentaron en áreas rurales del departamento de Bolívar en septiembre de 2014, y se estima que desde su introducción en el país hasta el año 2016, 19.435 personas fueron infectadas por el virus, de los cuales 202 fueron confirmados por laboratorio, 19.003 presentaron sintomatología relacionada a la enfermedad y 230 fueron casos sospechosos. De igual manera, para el 2017, se notificaron 1.128 casos potenciales de chikungunya, con 34 confirmados por laboratorio, 1050 confirmados clínicamente y 44 casos sospechosos (34).

Se ha expuesto que uno de los factores que influyó en la rápida diseminación de la enfermedad, así como en el número y severidad de las epidemias, fue la mutación genética A226V en la proteína E1 del virus, lo que favoreció la adaptación y replicación del CHIKV en el vector *Aedes albopictus*, un mosquito altamente invasivo y de amplia distribución global (35) (36) (37).

Actualmente, el virus del chikungunya afecta a personas en más de 60 países, convirtiéndose en un serio problema de salud pública que ha generado millonarias pérdidas económicas a causa de los años de vida perdidos por discapacidad (38).

La transmisión del virus se da principalmente de manera horizontal a través de dos ciclos conocidos como ciclo selvático y ciclo urbano (14). En el primero, el virus circula entre mosquitos generalmente del género *Aedes* los cuales actúan como vectores, y entre animales como primates no humanos que intervienen como reservorios. Aunque este ciclo es primordialmente epizootico, pueden llegar a presentarse algunos casos de infección en personas que habiten cerca de zonas selváticas (15). En el segundo, la transmisión ocurre mediante un ciclo humano-mosquito-humano, entre los vectores



*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y las poblaciones humanas que sirven como reservorios, generando de esta manera los brotes por el virus del Chikungunya a nivel urbano (17).

Cuando se produce la picadura de una persona por parte de un mosquito infectado, las partículas virales del CHIKV se depositan en los capilares subcutáneos, donde inicia la replicación en macrófagos y fibroblastos. Posteriormente, el virus se disemina hacia los linfonodos y la circulación sanguínea, desde donde se extiende principalmente hacia músculos y articulaciones; y en casos más severos hacia el hígado, bazo y sistema nervioso central (39) (40).

De igual manera, durante el periodo virémico que suele durar entre 5 a 7 días postinfección (21), se presenta una respuesta inmune mediada por varias citoquinas proinflamatorias como interferón  $\alpha$ , interferón  $\gamma$ , interleucina 6 y citoquinas antiinflamatorias como interleucina 4 e interleucina 10 (41) (42).

La fase aguda de la enfermedad comienza luego de un periodo de incubación viral de 2-4 días, y dura aproximadamente unas 3 semanas (33) (3). Durante esta etapa se pueden presentar manifestaciones clínicas como poliartralgias, edemas periarticulares, erupciones cutáneas, eritemas, mialgias, dolores de cabeza, fotofobia, fiebre, náuseas, vómitos y en algunos casos, complicaciones más serias como uveítis, miocarditis, hepatitis, nefritis, meningoencefalitis y el síndrome de Guillain-Barré (12) (43) (44) (45) (46).

Por otro lado, en la fase crónica, los desórdenes musculoesqueléticos como artralgia o artritis se presentan durante meses e incluso años después del contagio (47). En estos casos, los dolores articulares suelen ser recurrentes o persistentes, disminuyendo la calidad de vida de las personas tanto física como mentalmente (48). Se ha determinado que los factores de riesgo para desarrollar CHIKV crónico son la edad avanzada, una larga duración de la fase aguda de la enfermedad o una patología articular previa (14) (49).

Entre otras cosas, se presume que del 30% al 40% de los individuos infectados experimentan artralgias durante años, y que, además, el 15% desarrolla la enfermedad de manera asintomática (50).

De igual forma, la transmisión vertical en mujeres embarazadas ha sido reportada, con graves complicaciones para el neonato como fiebre, dolor, irritabilidad, erupciones cutáneas, meningoencefalitis, insuficiencia respiratoria aguda y en algunos casos severos, la muerte (51) (52).

El diagnóstico de la fiebre del chikungunya se realiza esencialmente a través de métodos de laboratorio entre los que incluyen las pruebas de PCR, serología y aislamiento del virus.

En fases agudas, las serologías como los test ELISA o inmunocromatografía se recomiendan después de los primeros 5 días de infección, con el fin de detectar títulos de IgM, IgG y anticuerpos neutralizantes (53). De igual modo, estas pruebas también son efectivas para el diagnóstico de casos crónicos, puesto que la IgM persiste por hasta 1 año y la IgG permanece de por vida (24) (54). Por otro lado, el aislamiento del virus debe realizarse con muestras recolectadas al octavo día de infección o antes y sus resultados pueden ser confirmados mediante inmunofluorescencia o RT-PCR (33). Por último, los métodos de caracterización del material genético del virus como el RT-PCR o RT-PCR en tiempo real se recomiendan ejecutar entre los días 1 y 8 de infección. Las muestras desde donde se ha logrado identificar el virus mediante esta prueba han provenido de suero, saliva, semen, orina y líquido cefalorraquídeo (38) (55) (56) (57).

Diferentes especies animales han sido objeto de estudio de múltiples investigaciones relacionadas a la infección por el CHIKV, principalmente en aquellas en que se usan como modelos para esclarecer aspectos clínicos e inmunopatológicos de la enfermedad (58) (59) (60). Entre estos, los primates y pequeños roedores han sido los principalmente analizados, dada su similitud y parentesco genético con los humanos (61) (62) (63). Sin embargo, el creciente interés sobre aspectos relacionados a las dinámicas de transmisión del virus, han ampliado el número de especies incluidas en recientes investigaciones (64).

En efecto, entre estos temas se destaca la identificación de potenciales reservorios animales del CHIKV y su rol en la persistencia y replicación del virus en la naturaleza, especialmente en los ciclos de transmisión epizoótica (19).

Para que un animal sea considerado reservorio, debe presentar una infección crónica o persistente, con o sin manifestación de la enfermedad, pero con presencia suficiente de partículas virales en sangre o fluidos corporales como para ser fuente de infección para otras especies de vertebrados o artrópodos (65) (66).

En África, particularmente, se ha planteado la existencia de un ciclo de transmisión selvática del CHIKV, en donde los primates no humanos intervienen como el principal reservorio de este patógeno (67) (68). Varios estudios han identificado anticuerpos específicos contra el virus en monos rojos (*Erythrocebus patas*) y monos tantalus (*Cercopithecus aethiops tantalus*) de Nigeria (69), al igual que en monos verdes africanos (*Chlorocebus sabaeus*) y papiones negros (*Papio ursius*) de Senegal y Sur de África (70) (71). En Asia, aunque no se ha demostrado la existencia actual de ciclos epizooticos del CHIKV, macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) de Filipinas y Malasia fueron detectados como seropositivos (72) (73).

De igual manera, estudios observacionales y experimentales han reportado seroprevalencias en otros animales como pequeños roedores, murciélagos y aves. Aunque pocas de estas especies manifestaron una viremia marcada, la mayoría presento anticuerpos neutralizantes como respuesta al virus (74) (75) (76) . Finalmente, reptiles y anfibios también han sido señalados como potenciales reservorios, ya que tras la inoculación experimental del CHIKV han desarrollado títulos viremicos suficientes como para infectar artrópodos hematófagos (77) .

### **Virus del Zika (ZIKV)**

El Virus del Zika es un arbovirus que pertenece al género de los *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (78). Está compuesto por un cápside icosaédrica, una envoltura y un genoma ARN monocatenario positivo, el cual codifica 3 proteínas estructurales (C, PrM, E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (79) (80). Además, se han reconocido dos diferentes linajes del ZIKV, el linaje África que a su vez contiene dos subtipos (África Este y África Oeste) y el linaje Asia que incluye tres subtipos (Sudeste de Asia, Islas Americanas y Pacífico) (80) (81).

El ZIKV fue identificado por primera vez en 1947 en una muestra de suero de un Macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) que habitaba el bosque de Zika en Uganda (82).

En humanos, los primeros casos relacionados al ZIKV fueron reportados a inicios de los años 50 en Tanzania, Uganda y Nigeria (83) (84). Durante los años posteriores, algunos países de África y Asia experimentaron infecciones ocasionales, sin mayor impacto sobre la salud pública de estos territorios (85) (86) (6).

Para el 2007, el primer brote del virus por fuera de estos continentes se presentó en la isla de Yap, donde se estima se vieron afectados alrededor del 73% de los residentes, con manifestaciones clínicas de la enfermedad en el 18% de los infectados (10). Entre el 2013-2014, el virus alcanzo otras islas del Pacífico como la Polinesia Francesa (29.000 casos sospechosos y 396 confirmados de infección), la isla de Cook, Nueva Caledonia y la isla de Pascua (87) (88) (89) (90).

En el 2015, se presentó la primera gran epidemia del ZIKV en las Américas, concretamente en Brasil, con un estimado de 440.000 a 1.3 millones de casos de infección solo en ese año (11). Posteriormente, el virus se diseminó hacia otras regiones del continente, y para finales de 2016, 48 países ya habían reportado transmisión autóctona del ZIKV entre sus poblaciones (16). En Colombia, particularmente, entre 2015-2016 se reportaron un total de 65.726 casos de infección, siendo confirmados 2.485 (4%) por laboratorio, con una posterior disminución en el 2017, con 1.750 casos, de los cuales 57 fueron confirmados (34).

Al igual que otros arbovirus como el CHIKV, la principal ruta de transmisión del virus del Zika es mediante la picadura de un artrópodo hematófago infectado, durante los ciclos selváticos (primate no humano-mosquito-primate no humano; infección accidental en personas) y urbanos (humano-mosquito-humano) (16). En este último, el principal vector implicado es el *Aedes aegypti*, aunque se ha sugerido que el *Aedes albopictus* podría estar igualmente involucrado en la diseminación de la enfermedad, especialmente en las Américas (18).

De igual manera, otras vías de contagio del ZIKV que se han descrito son las relaciones sexuales, transfusiones sanguíneas y la transmisión materno-fetal (91) (92) (93).

Cuando se produce la infección por la picadura de un mosquito, el virus inicia su replicación en los queratinocitos, fibroblastos y células de Langerhans de la piel, para

posteriormente diseminarse hacia los linfonodos y circulación sanguínea, desde donde llega a músculos, SNC y al feto, en el caso de las mujeres embarazadas (22) (94).

Aunque la mayoría de los casos de ZIKV se desarrollan de manera asintomática, luego de un periodo de incubación de entre 3-12 días las personas infectadas pueden manifestar fiebre, erupciones maculopapulares, conjuntivitis, dolores de cabeza, mialgia, vómitos, mareos, artritis y artralgia (95) (96) . Además, otras complicaciones relacionadas a la enfermedad son el síndrome de Guillain-Barre y la microcefalia en neonatos (97) (13). Se ha expuesto que el riesgo de que se presenten malformaciones congénitas en los casos de transmisión materno-fetal es del 10 al 15% (98).

El diagnóstico del virus del Zika se basa principalmente en métodos de laboratorio que incluyen el RT-PCR y la serología. Durante la fase aguda de la enfermedad, se recomienda realizar la prueba de RT-PCR en los primeros 7 días después de iniciada la sintomatología (99). Esta técnica es rápida y altamente sensible, siendo posible identificar el virus en muestras de suero, saliva, orina, semen y líquido cefalorraquídeo (LCR) (100) (101).

Por otro lado, teniendo en cuenta que los títulos viremicos disminuyen después del séptimo día, los test de PCR pueden arrojar resultados negativos, sin embargo, esto no descarta la infección por el ZIKV, por lo que pruebas de serología deben ser complementarias (96). Entre estas encontramos la técnica ELISA, la cual permite detectar títulos de anticuerpos IgM e IgG en suero y LCR (102). De igual manera, dada la reactividad cruzada del ZIKV con otros flavivirus, los resultados deben ser confirmados mediante pruebas más específicas como el test de neutralización por reducción de placas (PRNT) (103).

Finalmente, diferentes estudios han buscado definir el papel que juegan los animales en la persistencia del virus en la naturaleza y su implicación en la transmisión hacia poblaciones humanas (20). En primer lugar, se ha expuesto que los primates no humanos actúan como reservorios del ZIKV especialmente en ecosistemas forestales (104). Por ejemplo, en países africanos y asiáticos como Gabón, Uganda y Malasia, se han reportado seroprevalencias en monos que habitaban zonas selváticas (105) (106) (107) . De igual manera, recientemente en Brasil, se documentó la posible

circulación del virus en monos ardilla (*Samiri sciureus*) y monos capuchinos (*Cebus capucinus*) en los estados de Ceará y Pernambucano (4) (108).

Por otro lado, diversos estudios han evidenciado que, tras la infección experimental y natural por el ZIKV, varias especies animales han desarrollado anticuerpos específicos contra el virus, como pequeños roedores, ovejas, cabras, vacas, caballos, patos, cerdos, hurones y algunos reptiles, indicando una posible susceptibilidad a la infección por el virus del Zika (109) (110) (111) (112).

El objetivo general de esta investigación fue reconocer potenciales reservorios animales de los virus del Chikungunya y Zika mediante una revisión sistemática y meta-análisis.

## **Materiales y métodos**

### **Búsqueda de literatura:**

Se realizó una búsqueda sistemática de literatura en las bases de datos Web of Sciences, Scopus, PubMed, SciELO, Lilacs y Google Scholar para evaluar la proporción de animales infectados con CHIKV y ZIKV definidos por técnicas moleculares y / o inmunológicas. La búsqueda se limitó a artículos en inglés y español, sin fijarse un límite para el año de publicación de los estudios.

### **Elegibilidad y selección de estudios:**

Se incluyeron los estudios originales en los que se identificó el número de animales infectados con CHIKV y ZIKV a través de técnicas moleculares y/o inmunológicas.

Se excluyeron en un principio los artículos que se encontraban repetidos en las tres bases de datos. Posteriormente los artículos obtenidos fueron analizados por títulos y resúmenes con el fin de identificar posibles estudios elegibles por todos los autores. El texto completo de los posibles artículos para selección, fue revisado detalladamente, y se excluyeron aquellos estudios de revisión y en los que no se especificaba la especie analizada. Finalmente se excluyeron aquellos estudios en los que no se evaluó la prevalencia de infección por CHIKV y ZIKV en animales (Figura 1).

### **Análisis de datos:**

Los meta-análisis fueron realizados usando Stata, versión 11.0 y la hoja de cálculo de Microsoft Excel ® desarrollada por Neyeloff et al (113), particularmente para los gráficos de árbol (*forest plots*), OpenMeta-Analysis y CMA.

Las prevalencias combinadas y sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (IC95%) fueron usados para resumir el efecto del tamaño de cada grupo de estudio-variable. Se usó el modelo de efectos aleatorios, el cual fue seleccionado tomando en consideración las características iniciales de los estudios, dado el grado variable de heterogeneidad en los datos y dada la heterogeneidad inherente que hay en una revisión sistemática de estudios publicados en la literatura como esta. Se usó un nivel alfa de 5% de dos colas para las pruebas de hipótesis.

Se estimaron y reportaron las medidas de heterogeneidad, incluyendo el estadístico Q de Cochrane, el índice  $I^2$  y la prueba de tau cuadrado ( $\tau^2$ ). Además, se realizaron sub-análisis según la clase de animal y prevalencia de arbovirus.



## Resultados

Al 1 de Julio de 2019, la búsqueda de literatura arrojó inicialmente 2639 artículos (719 de CHIKV y 1920 de ZIKV), de los cuales solo 9 fueron válidos para incluir en el meta-análisis (Figura 1). Los estudios incluidos fueron publicados entre 2010 y 2019, y reportaron datos sobre 715 animales analizados para el virus del Chikungunya (192 mediante serología + PCR; 523 solo con serología), y 6271 analizados para el virus del Zika (6119 a través de serología; 152 mediante PCR) (Tabla 1).

Por otro lado, de los animales analizados para CHIKV, 267 fueron mamíferos, 238 reptiles, 167 anfibios y 43 aves. De igual manera, para ZIKV, las especies estudiadas fueron 6185 mamíferos, 49 aves, 35 reptiles y 2 peces.

De acuerdo a los análisis realizados, la prevalencia combinada de CHIKV mediante PCR (N=192) fue de 30.1% [95%CI (17.5%-42.7%),  $\tau^2=0.160$ ,  $I^2=87.94$ ,  $Q=381.43$ ,  $p<0.001$ ], con los valores más altos reportados en los anfibios pertenecientes al género *Lithobates* (97.6%), seguido de los reptiles *Thamnophis sirtalis* (73.8%) e *Iguana iguana* (59.8%) (Figura 2A). Por otra parte, la media de viremia para CHIKV (N=154) fue de 2.051  $\log_{10}$  unidades formadores de placas (PFU)/mL [95%CI (1.720-2.382),  $\tau^2=1.230$ ,  $I^2=99.997$ ,  $Q=1453595.042$ ,  $p<0.001$ ], siendo mayor en la especie *Eptesicus fuscus* (5.500, 4.389-6.611), seguido del *Mesocricetus auratus* (5.500, 3.484-7.516) y *Sigmodon hispidus* (5.000, 4.992-5.008) (Figura 2B). Finalmente, la seroprevalencia combinada para CHIKV (N=715) fue de 38.3% [95%CI (31.6%-45.0%),  $\tau^2=0.060$ ,  $I^2=87.967$ ,  $Q=631.603$ ,  $p<0.001$ ], con mayores valores en las especies *Alligator mississippiensis* (92.9%), *Thamnophis sirtalis* (91.7%) y *Marmota monax* (90%) (Figura 2C) (Tabla 1).

En cuanto a ZIKV, la prevalencia combinada por PCR (N=152) fue de 4.8% [95%CI (1.0%-8.6%),  $\tau^2<0.001$ ,  $I^2=21.94$ ,  $Q=2.562$ ,  $p=0.013$ ], con mayores índices en los primates no humanos de la familia *Callitrichidae* (9%) (Figura 2D). De igual manera, la seroprevalencia combinada para ZIKV (N=6119) fue de 4.3% [95%CI (3.0%-5.6%),  $\tau^2=0.001$ ,  $I^2=90.495$ ,  $Q=326.152$ ,  $p<0.001$ ], con mayores valores en primates de la familia *Cercopithecidae* (50%), y en el pez *Gymnocephalus cernua* (50%) (Figura 2E) (Tabla 1).

Por otra parte, en los sub-análisis realizados por arbovirus y clases de animales, se determinó que los reptiles presentaron una mayor prevalencia de CHIKV mediante PCR (66.5%, 37.4%-95.6%), seguido de los anfibios (56.3%, 11%-100%) y los mamíferos (24.9%, 16.4%-33.4%) (Figura 3A). Además, la seroprevalencia de ZIKV en mamíferos fue de 4.4% (3.1%-5.8%) (Figura 3B) (Tabla 2).

## Discusión

A diferencia del presente meta-análisis, no existen otros estudios que hayan medido las prevalencias combinadas de ambos virus en animales, y de acuerdo a sus resultados, los índices de prevalencia y seroprevalencia de CHIKV y ZIKV en estas especies es mayor a la esperada, de acuerdo a reuniones con expertos y con algunos estudios que han mostrado frecuencias bajas.

De igual manera, los hallazgos de prevalencia molecular y seroprevalencia de CHIKV en animales, es consistente (>30%). Además, en el caso de ambos métodos de diagnóstico, los mayores valores de infección se presentaron en reptiles y anfibios, lo que ha planteado la posibilidad de que algunas especies de vertebrados ectodermos podrían actuar como reservorios de estos arbovirus, aunque son necesarios mayores estudios con el fin de evaluar este comportamiento (77).

Por otro lado, aunque el espectro de especies positivas se presenta amplio, la sola presencia de CHIKV en animales no garantiza ser un apropiado reservorio, ya que este aspecto debe ir relacionado a la competencia y patrón de alimentación del vector, además de la capacidad del animal de presentar una infección crónica o persistente, con presencia suficiente de partículas virales en sangre o fluidos corporales como para ser fuente de infección para otras especies de vertebrados o artrópodos (65) (66).

De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que algunos estudios han determinado que un mosquito como el *Aedes albopictus* puede infectarse de sangre que contenga entre 3.6 a 3.9 log<sub>10</sub> PFU/ml de Chikungunya (114) (115), animales como el *Eptesicus fuscus* (5.5 log<sub>10</sub> PFU/ml) y el *Mesocricetus auratus* (5.5 log<sub>10</sub> PFU/ml), podrían actuar como fuente de infección de artrópodos en los ciclos de transmisión epizoóticos de este virus.

Igualmente, aunque las prevalencias de CHIKV son mayores que las de ZIKV (30% vs 4%), existió una mayor representatividad y estudios sobre el virus del Chikungunya, sin embargo, esto podría relacionarse a la prevalencia de CHIKV y ZIKV en humanos, que también es significativamente mayor (4 a 1).

Entre otras cosas, los hallazgos de prevalencia molecular y seroprevalencia de virus del Zika en animales, es consistente (4%), pero el número de estudios es limitado, por

lo que el espectro de especies positivas fue menos amplio que en el caso del Chikungunya.

En efecto, al igual que en el CHIKV, la presencia de ZIKV en animales no garantiza ser un apropiado reservorio, ya que se deben tener en cuenta aspectos relacionados al comportamiento del vector y de la propia especie afectada.

Finalmente, es poco probable que, a diferencia de los primates no humanos, otras especies animales estén involucradas en la persistencia y transmisión del virus en la naturaleza, aunque, como en el caso del virus del Zika, los estudios siguen siendo limitados, por lo que la necesidad de futuras investigaciones relacionadas a este aspecto es evidente.

## **Conclusiones y recomendaciones**

A pesar de que las tasas de infección del virus del Chikungunya y del Zika han disminuido durante los últimos años, ambos agentes se presentan como endémicos en algunas regiones del continente americano, por lo que su vigilancia y control debe ser continuo.

Igualmente, los índices de prevalencia y seroprevalencia de CHIKV en algunas especies animales fue mayor al esperado, principalmente en reptiles y anfibios, por lo mayores investigaciones son necesarias, con el objetivo de identificar potenciales reservorios diferentes a los primates no humanos en la naturaleza.

Por otra, pocos estudios evaluaron aspectos relacionados a la infección del virus del Zika en animales, por lo que fue limitado el espectro de especies positivas, así como su análisis.

Por último, se requieren más estudios, especialmente de seroprevalencia en zonas endémicas de infección en humanos, no solo en los virus del CHIKV y ZIKV, sino también de otras arbovirosis emergentes como el Mayaro, Oropouche, Madariaga, entre otros.

## Bibliografía

1. Marklewitz M, Junglen S. Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses. *Acta tropica*. 2019;190:52-8.
2. McArthur DB. Emerging Infectious Diseases. *The Nursing clinics of North America*. 2019;54(2):297-311.
3. Figueiredo ML, Figueiredo LT. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014;47(6):677-83.
4. de Oliveira-Filho EF, Oliveira RAS, Ferreira DRA, Laroque PO, Pena LJ, Valenca-Montenegro MM, et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. *Transboundary and emerging diseases*. 2018;65(4):1094-7.
5. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(4):e107-e17.
6. Smithburn KC, Kerr JA, Gatne PB. Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1954;72(4):248-57.
7. Bonn D. How did chikungunya reach the Indian Ocean? *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(9):543.
8. Yactayo S, Staples JE, Millot V, Cibrelus L, Ramon-Pardo P. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases*. 2016;214(suppl\_5):S441-S5.
9. Marano G, Pupella S, Pati I, Masiello F, Franchini M, Vaglio S, et al. Ten years since the last Chikungunya virus outbreak in Italy: history repeats itself. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2017;15(6):489-90.
10. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(24):2536-43.
11. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(3):55-8.
12. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual review of medicine*. 2018;69:395-408.
13. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2016;47(1):6-7.
14. Bautista-Reyes E, Nunez-Avellaneda D, Alonso-Palomares LA, Salazar MI. Chikungunya: Molecular Aspects, Clinical Outcomes and Pathogenesis. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2017;69(6):299-307.
15. Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordin L. Chikungunya virus infection: an overview. *The new microbiologica*. 2013;36(3):211-27.
16. Song BH, Yun SI, Woolley M, Lee YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*. 2017;308:50-64.
17. Young PR. Arboviruses: A Family on the Move. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1062:1-10.
18. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(7):1185-92.
19. Kuno G, Mackenzie JS, Junglen S, Hubalek Z, Plyusnin A, Gubler DJ. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses*. 2017;9(7).

20. Bueno MG, Martinez N, Abdalla L, Duarte Dos Santos CN, Chame M. Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(12):e0005073.
21. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses--an overview. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(7):420-9.
22. Higuera A, Ramirez JD. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta tropica*. 2019;190:99-111.
23. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology*. 2009;4(7):837-56.
24. Moizeis RNC, Fernandes T, Guedes P, Pereira HWB, Lanza DCF, Azevedo JWV, et al. Chikungunya fever: a threat to global public health. *Pathogens and global health*. 2018;112(4):182-94.
25. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of virology*. 2010;84(13):6497-504.
26. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1955;49(1):28-32.
27. Filipe AF, Pinto MR. Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus. *Bulletin of the World Health Organization*. 1973;49(1):37-40.
28. Eisenhut M, Schwarz TF, Hegenscheid B. Seroprevalence of dengue, chikungunya and Sindbis virus infections in German aid workers. *Infection*. 1999;27(2):82-5.
29. Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CH, et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 11):2754-60.
30. Sergon K, Yahaya AA, Brown J, Bedja SA, Mlindasse M, Agata N, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;76(6):1189-93.
31. Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 7):1967-76.
32. Cassadou S, Boucau S, Petit-Sinturel M, Huc P, Leparac-Goffart I, Ledrans M. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(13).
33. Cunha RVD, Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(8):523-31.
34. Rico-Mendoza A, Alexandra PR, Chang A, Encinales L, Lynch R. Co-circulation of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Colombia from 2008 to 2018. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2019;43:e49.
35. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens*. 2007;3(12):e201.
36. Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology*. 2004;18(3):215-27.
37. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(5):e646.
38. Lee H, Halverson S, Ezinwa N. Mosquito-Borne Diseases. *Primary care*. 2018;45(3):393-407.
39. Lum FM, Ng LF. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral research*. 2015;120:165-74.

40. Kam YW, Ong EK, Renia L, Tong JC, Ng LF. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes and infection*. 2009;11(14-15):1186-96.
41. Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, et al. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *J Infect Dis*. 2015;211(12):1925-35.
42. Chirathaworn C, Poovorawan Y, Lertmaharit S, Wuttirattanakowit N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2013;6(8):631-4.
43. Hochedez P, Jaureguiberry S, Debruyne M, Bossi P, Hausfater P, Brucker G, et al. Chikungunya infection in travelers. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(10):1565-7.
44. Mahendradas P, Avadhani K, Shetty R. Chikungunya and the eye: a review. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2013;3(1):35-.
45. Balavoine S, Pircher M, Hoen B, Herrmann-Storck C, Najioullah F, Madeux B, et al. Guillain-Barre Syndrome and Chikungunya: Description of All Cases Diagnosed during the 2014 Outbreak in the French West Indies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;97(2):356-60.
46. Cerny T, Schwarz M, Schwarz U, Lemant J, Gerardin P, Keller E. The Range of Neurological Complications in Chikungunya Fever. *Neurocritical care*. 2017;27(3):447-57.
47. Amaral JK, Bilsborrow JB, Schoen RT. Brief report: the disability of chronic chikungunya arthritis. *Clinical rheumatology*. 2019.
48. Kuna A, Gajewski M. Chronic symptoms persisting after travel-related infections. *International maritime health*. 2018;69(3):207-12.
49. Couturier E, Guillemin F, Mura M, Leon L, Virion JM, Letort MJ, et al. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012;51(7):1315-22.
50. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(7):491-500.
51. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. *PLOS Medicine*. 2008;5(3):e60.
52. Torres JR, Falleiros-Arlant LH, Duenas L, Pleitez-Navarrete J, Salgado DM, Castillo JB. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;51:85-8.
53. Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2014;7(12):925-32.
54. Litzba N, Schuffenecker I, Zeller H, Drosten C, Emmerich P, Charrel R, et al. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *Journal of virological methods*. 2008;149(1):175-9.
55. Johnson BW, Russell BJ, Goodman CH. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl 5):S471-s4.
56. Musso D, Teissier A, Rouault E, Teururai S, de Pina J-J, Nhan T-X. Detection of chikungunya virus in saliva and urine. *Virology Journal*. 2016;13(1):102.
57. Bandeira AC, Campos GS, Rocha VF, Souza BS, Soares MB, Oliveira AA, et al. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. *IDCases*. 2016;6:100-3.
58. Broeckel R, Haese N, Messaoudi I, Streblow DN. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model). *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2015;4(3):662-81.
59. Chan YH, Lum FM, Ng LFP. Limitations of Current in Vivo Mouse Models for the Study of Chikungunya Virus Pathogenesis. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2015;3(3):64-77.
60. Haese NN, Broeckel RM, Hawman DW, Heise MT, Morrison TE, Streblow DN. Animal Models of Chikungunya Virus Infection and Disease. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl 5):S482-S7.



61. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(3):894-906.
62. Morrison TE, Oko L, Montgomery SA, Whitmore AC, Lotstein AR, Gunn BM, et al. A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. *The American journal of pathology*. 2011;178(1):32-40.
63. Higgs S, Ziegler SA. A nonhuman primate model of chikungunya disease. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(3):657-60.
64. Samy AM, Mascarenhas M, Garasia S, Berthiaume P, Corrin T, Greig J, et al. A scoping review of published literature on chikungunya virus. *Plos One*. 2018;13(11):e0207554.
65. Rodhain F. [The idea of natural reservoir in arbovirology]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990). 1998;91(4):279-82.
66. Abdussalam M. Significance of ecological studies of wild animal reservoirs of zoonoses. *Bulletin of the World Health Organization*. 1959;21(2):179-86.
67. Diallo D, Sall AA, Buenemann M, Chen R, Faye O, Diagne CT, et al. Landscape Ecology of Sylvatic Chikungunya Virus and Mosquito Vectors in Southeastern Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1649.
68. Eastwood G, Sang RC, Guerbois M, Taracha ELN, Weaver SC. Enzootic Circulation of Chikungunya Virus in East Africa: Serological Evidence in Non-human Kenyan Primates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;97(5):1399-404.
69. Boorman JP, Draper CC. Isolations of arboviruses in the Lagos area of Nigeria, and a survey of antibodies to them in man and animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1968;62(2):269-77.
70. McIntosh BM, Harwin RM, Paterson HE, Westwater ML. AN EPIDEMIC OF CHIKUNGUNYA IN SOUTH-EASTERN SOUTHERN RHODESIA. *The Central African journal of medicine*. 1963;9:351-9.
71. Althouse BM, Guerbois M, Cummings DAT, Diop OM, Faye O, Faye A, et al. Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. *Nature communications*. 2018;9(1):1046.
72. Inoue S, Morita K, Matias RR, Tuplano JV, Resuello RR, Candelario JR, et al. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *Journal of medical primatology*. 2003;32(2):89-94.
73. Sam IC, Chua CL, Rovie-Ryan JJ, Fu JY, Tong C, Sitam FT, et al. Chikungunya Virus in Macaques, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(9):1683-5.
74. Bosco-Lauth AM, Nemeth NM, Kohler DJ, Bowen RA. Viremia in North American Mammals and Birds After Experimental Infection with Chikungunya Viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;94(3):504-6.
75. Vourc'h G, Halos L, Desvars A, Boué F, Pascal M, Lecollinet S, et al. Chikungunya antibodies detected in non-human primates and rats in three Indian Ocean islands after the 2006 ChikV outbreak. *Veterinary research*. 2014;45(1):52.
76. Stone D, Lyons AC, Huang YS, Vanlandingham DL, Higgs S, Blitvich BJ, et al. Serological evidence of widespread exposure of Grenada fruit bats to chikungunya virus. *Zoonoses and public health*. 2018;65(5):505-11.
77. Bosco-Lauth AM, Hartwig AE, Bowen RA. Reptiles and Amphibians as Potential Reservoir Hosts of Chikungunya Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2018;98(3):841-4.
78. Vorou R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;48:85-90.
79. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*. 2007;152(4):687-96.

80. Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparç-Goffart I, de Lamballerie X. Complete coding sequence of Zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. *Genome announcements*. 2014;2(3).
81. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1477.
82. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952;46(5):509-20.
83. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1954;48(2):139-45.
84. Galán-Huerta KA, Rivas-Estilla AM, Martínez-Landeros EA, Arellanos-Soto D, Ramos-Jiménez J. The Zika virus disease: An overview. *Medicina Universitaria*. 2016;18(71):115-24.
85. Darwish MA, Hoogstraal H, Roberts TJ, Ahmed IP, Omar F. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1983;77(4):442-5.
86. Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *The Journal of hygiene*. 1979;83(2):213-9.
87. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1085-6.
88. Iloos S, Mallet HP, Leparç Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*. 2014;44(7):302-7.
89. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):381-2.
90. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of virology*. 2016;161(3):665-8.
91. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(6):653-60.
92. Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(14):372-4.
93. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(14).
94. Javanian M, Babazadeh A, Ebrahimpour S. The immunopathogenesis of Zika virus: an overview. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*. 2018;56(2):128-9.
95. Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I. Zika virus. *BMJ (Clinical research ed)*. 2016;352:i1049.
96. Galindo-Fraga A, Ochoa-Hein E, Sifuentes-Osornio J, Ruiz-Palacios G. Zika Virus: A New Epidemic on Our Doorstep. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2015;67(6):329-32.
97. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10027):1531-9.
98. Reynolds MR, Jones AM, Petersen EE, Lee EH, Rice ME, Bingham A, et al. Vital Signs: Update on Zika Virus-Associated Birth Defects and Evaluation of All U.S. Infants with Congenital Zika Virus

Exposure - U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2017;66(13):366-73.

99. Asad H, Carpenter DO. Effects of climate change on the spread of zika virus: a public health threat. *Reviews on environmental health*. 2018;33(1):31-42.
100. Mauk MG, Song J, Bau HH, Liu C. Point-of-Care Molecular Test for Zika Infection. *Clinical laboratory international*. 2017;41:25-7.
101. Dias IKR, Sobreira C, Martins RMG, Santana KFS, Lopes M, Joventino ES, et al. Zika virus: - a review of the main aspects of this type of arbovirolosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018;51(3):261-9.
102. Karkhah A, Nouri HR, Javanian M, Koppolu V, Masrour-Roudsari J, Kazemi S, et al. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2018;37(11):2035-43.
103. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1347-50.
104. Ali S, Gugliemini O, Harber S, Harrison A, Houle L, Ivory J, et al. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(2):e0005135.
105. Saluzzo JF, Ivanoff B, Languillat G, Georges AJ. [Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon (author's transl)]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1982;75(3):262-6.
106. McCrae AW, Kirya BG. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1982;76(4):552-62.
107. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;64(5-6):310-6.
108. Favoretto SR, Araujo DB, Duarte NFH, Oliveira DBL, da Crus NG, Mesquita F, et al. Zika Virus in Peridomestic Neotropical Primates, Northeast Brazil. *EcoHealth*. 2019;16(1):61-9.
109. Olson JG, Ksiazek TG, Gubler DJ, Lubis SI, Simanjuntak G, Lee VH, et al. A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1983;77(2):131-7.
110. Ragan IK, Blizzard EL, Gordy P, Bowen RA. Investigating the Potential Role of North American Animals as Hosts for Zika Virus. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2017;17(3):161-4.
111. Beck C, Leparc-Goffart I, Desoutter D, Deberge E, Bichet H, Lowenski S, et al. Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019;13(2):e0007162.
112. Hutchinson EB, Chatterjee M, Reyes L, Djankpa FT, Valiant WG, Dardzinski B, et al. The effect of Zika virus infection in the ferret. *The Journal of comparative neurology*. 2019;527(10):1706-19.
113. Neyeloff JL, Fuchs SC, Moreira LB. Meta-analyses and Forest plots using a microsoft excel spreadsheet: step-by-step guide focusing on descriptive data analysis. *BMC research notes*. 2012;5:52.
114. Pesko K, Westbrook CJ, Mores CN, Lounibos LP, Reiskind MH. Effects of infectious virus dose and bloodmeal delivery method on susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to chikungunya virus. *Journal of medical entomology*. 2009;46(2):395-9.
115. Ledermann JP, Borland EM, Powers AM. Minimum infectious dose for chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2017;41:e65.

## Anexos:

**Tabla 1. Desenlaces en los Meta-análisis por cada variable a estudiar (modelos de efectos aleatorios)\*.**

Arbovirus	Estudios	N	Efecto combinado % (IC95%)	$Q^{\dagger}$	$I^2, \%^{\ddagger}$	$\tau^{2\S}$	$P$
<b>Chikungunya (CHIKV)</b>							
PCR	2	192	30.1 (17.5- 42.7)	381.43	87.94	0.160	<0.001
Viremia	2	-	2.051 log <sub>10</sub> PFU/ml (1.720- 2.382)	1453595.042	99.997	1.230	<0.001
Serología	3	715	38.3 (31.6- 45.0)	631.603	87.967	0.060	<0.001
<b>Zika (ZIKV)</b>							
PCR	2	152	4.8 (1.0- 8.6)	2.562	21.94	<0.001	0.013
Serología	3	6119	4.3 (3.0- 5.6)	326.52	90.495	0.001	<0.001

\* IC95% = Intervalo de confianza de 95%;

$\dagger$  Estadístico Q de Cochrane para heterogeneidad.

$\ddagger$  Índice  $I^2$  para el grado de heterogeneidad.

$\S$  Prueba de Tau cuadrado de heterogeneidad.

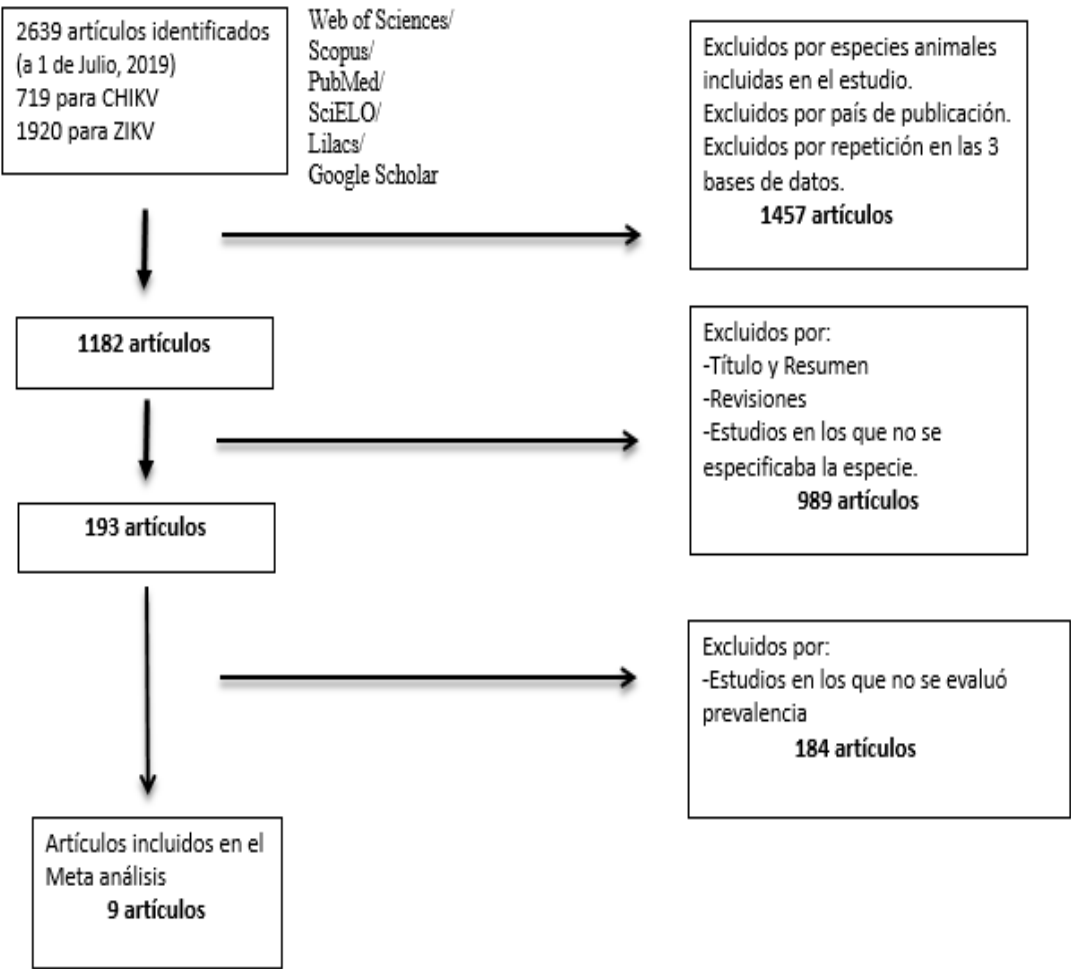
- No aplica.

Tabla 2. Desenlaces en los Meta-análisis por arbovirus y clases de animales (modelos de efectos aleatorios)\*.

Arbovirus	Estudios	N	Efecto combinado % (IC95%)	Q <sup>†</sup>	I <sup>2</sup> , % <sup>‡</sup>	τ <sup>2§</sup>	P
CHIKV- PCR							
Mamíferos	2	70	24.9 (16.4- 33.4)	19.953	4.78	-	<0.001
Reptiles	2	43	66.5 (37.4- 95.6)	46.221	87.02	-	<0.001
Anfibios	2	36	56.3 (1.1- 100)	46.675	95.62	-	0.046
Aves	1	43	13.7 (5.0- 22.4)	0.369	0	-	0.002
ZIKV- Serología							
Mamíferos	5	6033	4.4 (3.1- 5.8)	320.943	91.59	-	<0.001
Aves	1	49	4.1 (1.0- 9.6)	-	-	-	-
Reptiles	2	35	12.9 (1.0- 53.3)	1.878	46.74	-	0.531
Peces	1	2	50 (1.0- 100)	-	-	-	-

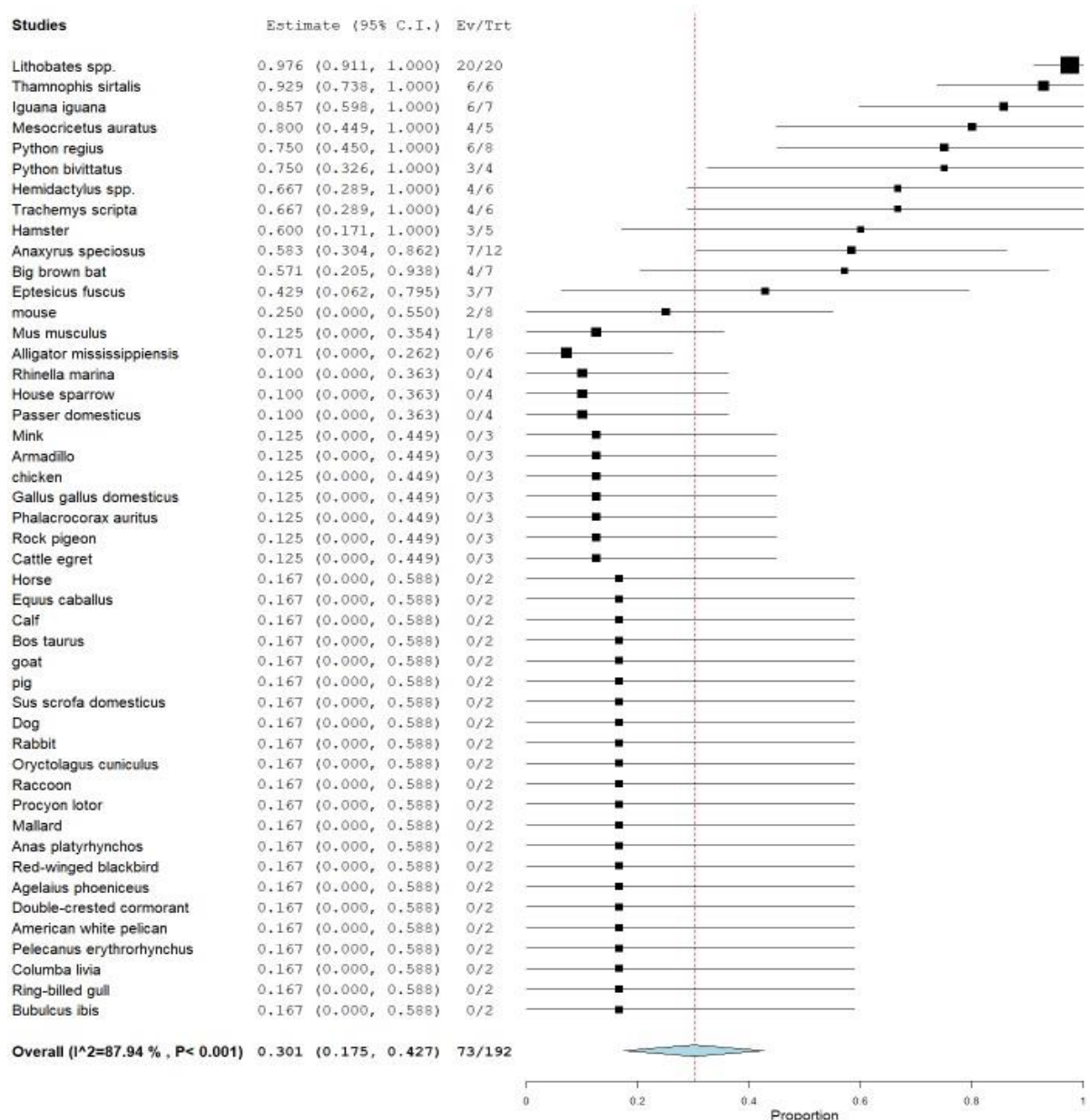
\* IC95% = Intervalo de confianza de 95%;  
† Estadístico Q de Cochrane para heterogeneidad.  
‡ Índice I<sup>2</sup> para el grado de heterogeneidad.  
§ Prueba de Tau cuadrado de heterogeneidad.  
- No aplica.

**Figura 1. Estrategia de búsqueda para la identificación de los artículos (Flujo grama)**

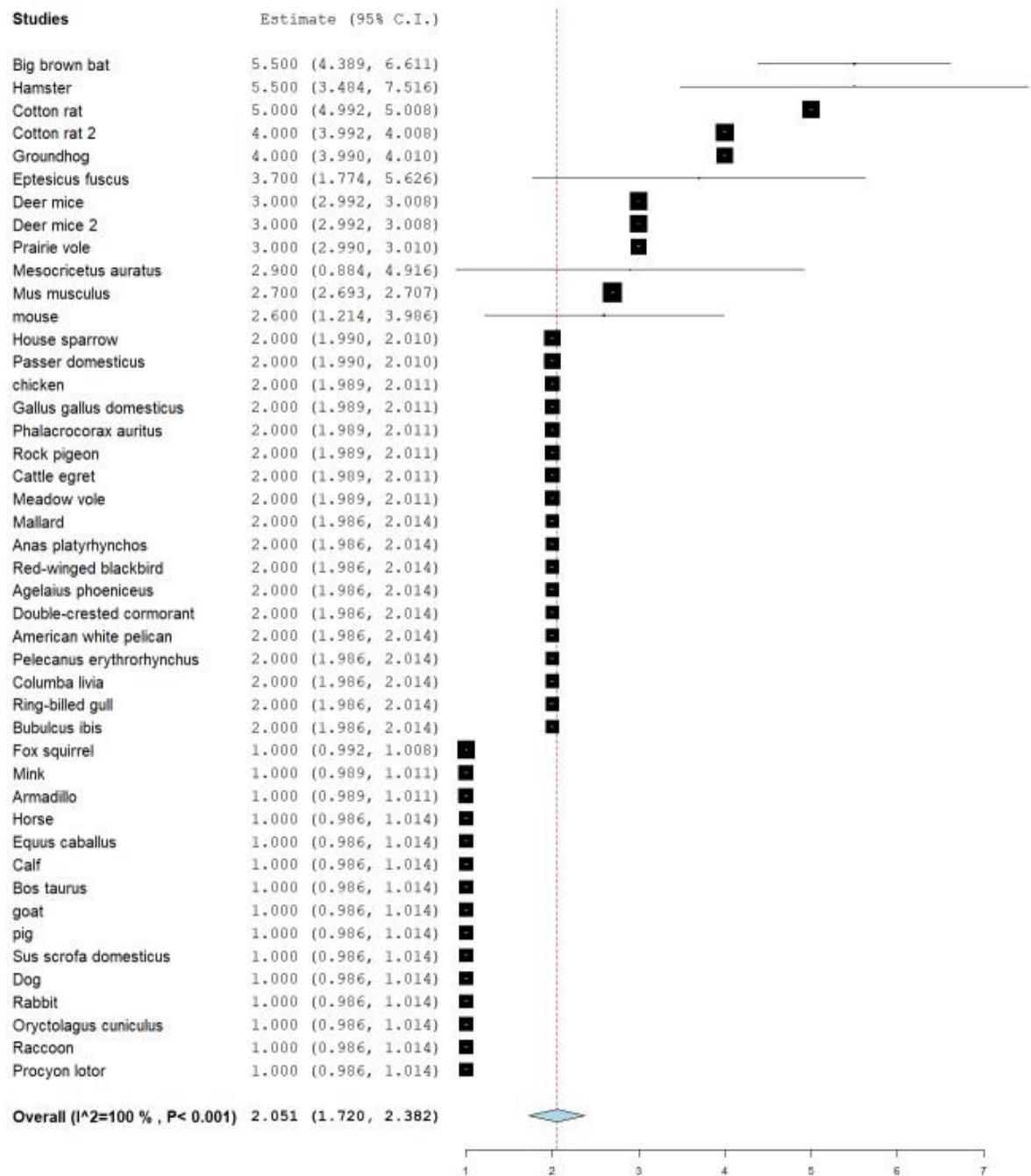


**Figura 2.** Prevalencia de arbovirus, estimados (cuadros) con sus intervalos de confianza de 95% (barras) para cada estudio seleccionado; los estimados de prevalencia combinada están representados por rombos o diamantes en estos gráficos. A) Prevalencia CHIKV por PCR. B) Media de viremia CHIKV. C) Seroprevalencia CHIKV. D) Prevalencia de ZIKV por PCR. E) Seroprevalencia ZIKV.

**A)**

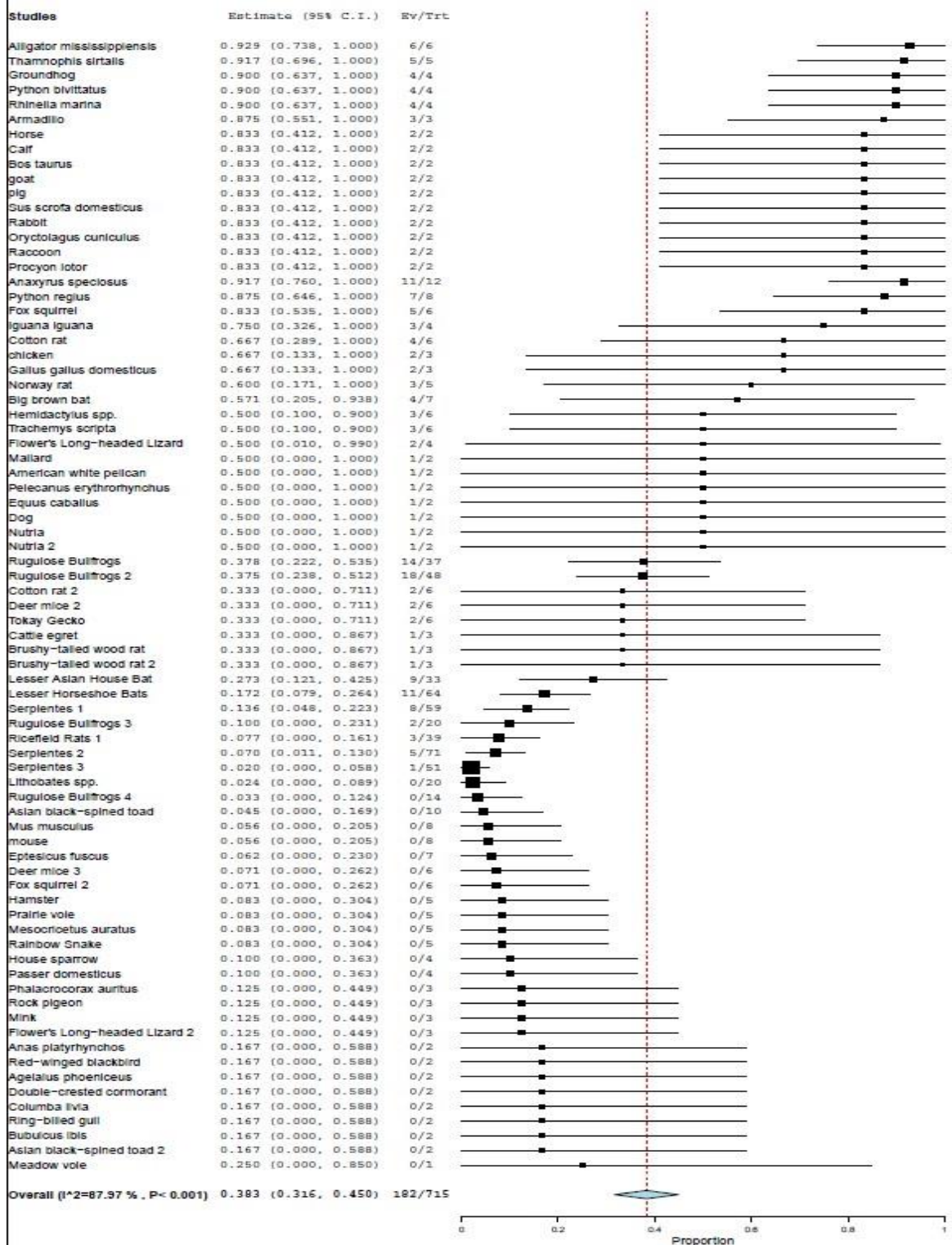


B)

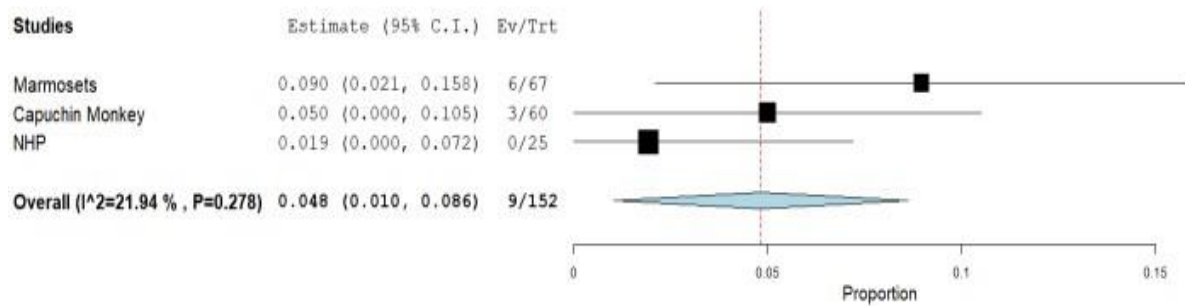




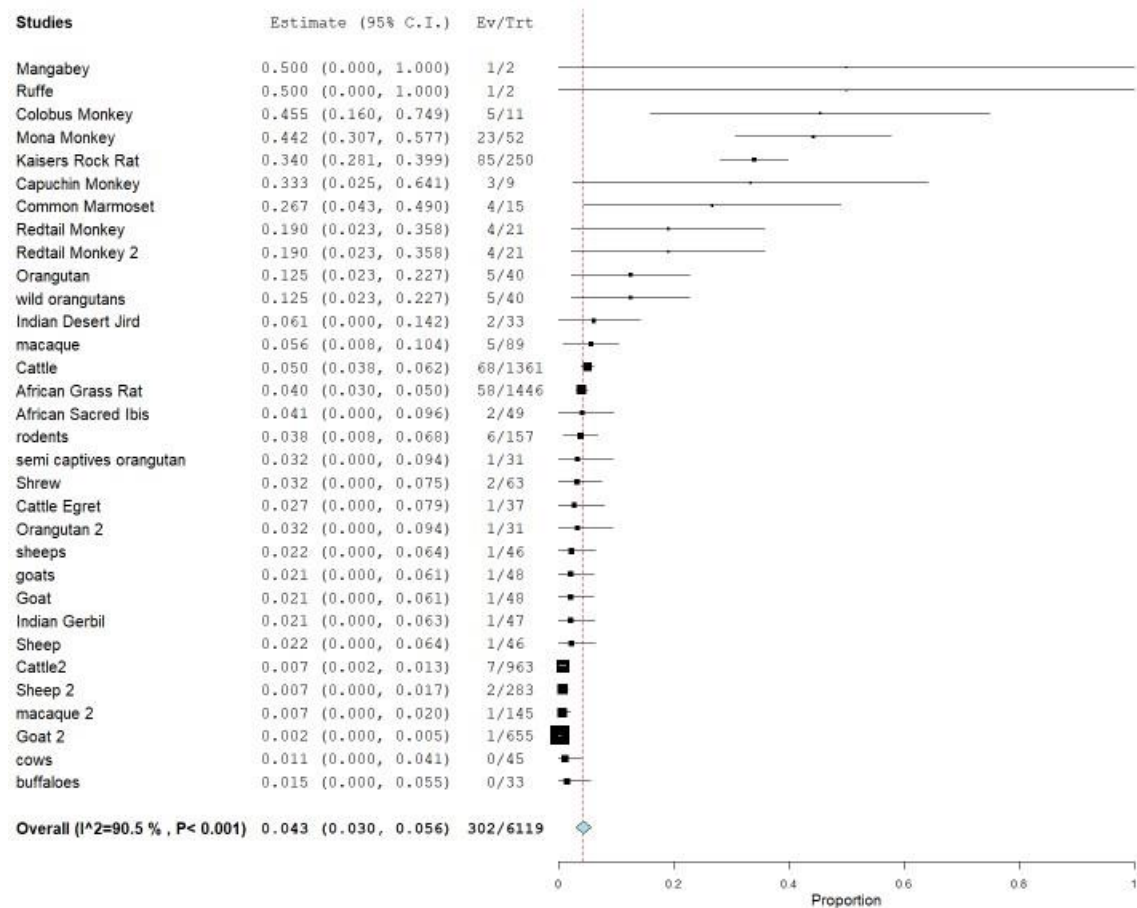
C)



D)

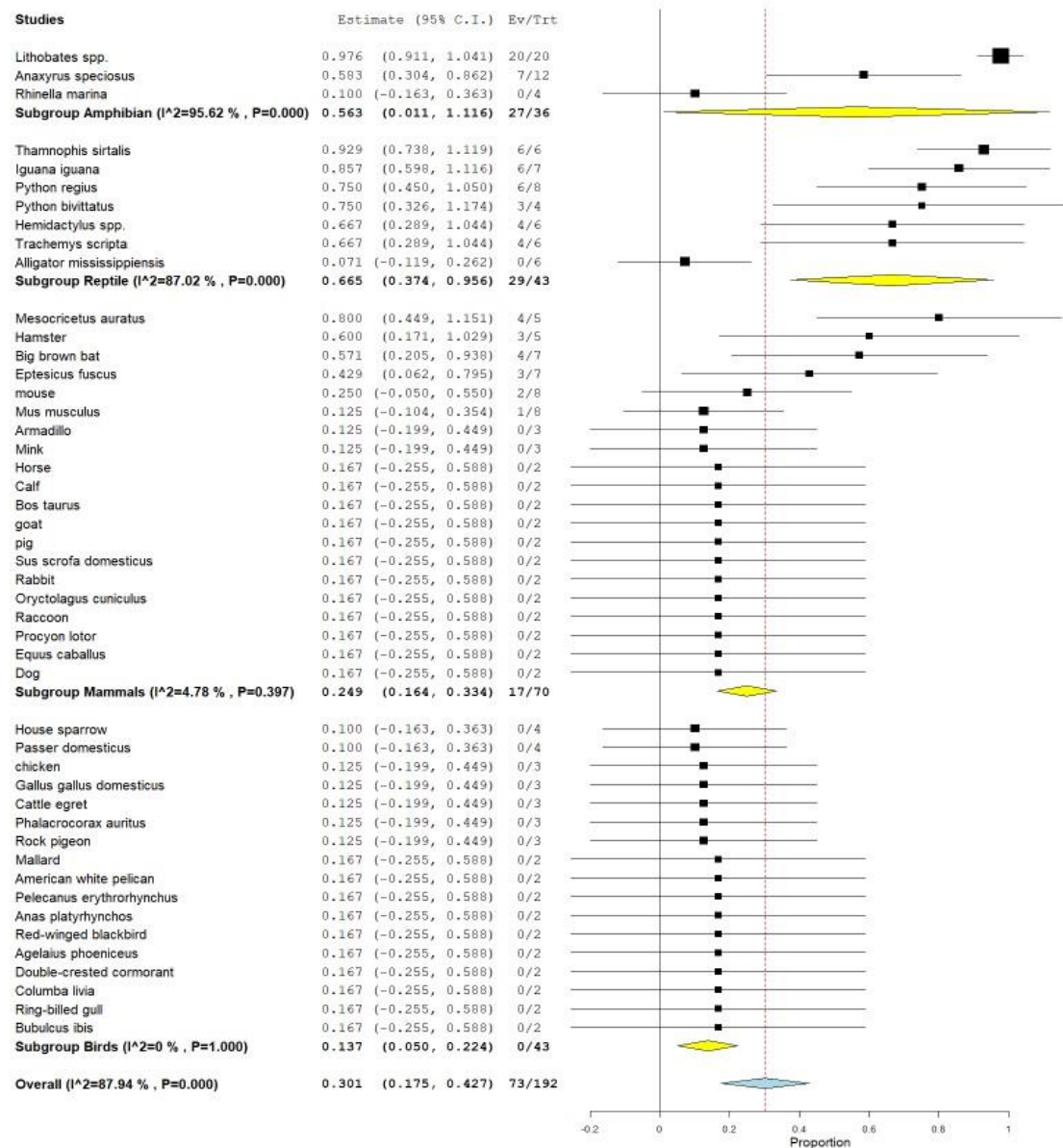


E)



**Figura 3.** Prevalencia de arbovirus por clases de animales, estimados (cuadros) con sus intervalos de confianza de 95% (barras) para cada estudio seleccionado; los estimados de prevalencia combinada están representados por rombos o diamantes en estos gráficos. A) Prevalencia CHIKV por PCR. B) Seroprevalencia ZIKV.

**A)**



B)

